SNI 01-2337-1991

Standar Nasional Indonesia

Penentuan staphylococcus aureus

ICS 67.120.30

Badan Standardisasi Nasional

Daftar isi

Penentuan staphylococcus aureus

0. Pendahulaun

Staphylococcus aureus sangat mudah rusak atau mati dengan pemanasan dan penggunaan bahan-bahan sanitasi. Oleh sebab itu, apabila S. aurearus atau enteretoksinnya ditemui pada bahan makanan yang telah diproses atau dalam alatalat pengolahan, maka hal ini menunjukkan keadaan sanitasi yang buruk.
S. auereus dapat menyebabkan keracunan makanan yang sangat berat, bagi yang mengkonsumsinya. Ini telah diidentifikasikan sebagai bahan penyebab pada banyak keracunan makanan dan mungkin bertanggung jawab terhadap banyak kasus-kasus lain, baik secara individu atau keluarga yang mungkin tidak tercatat. Makanan diperiksa terhadap adanya S. aureus dan/atau enterotoksinya :

1) Untuk meyakinkan bahwa ia penyebab dan penyakit yang disebabkan karena memakan bahan makanan yang telah terkontaminasi.
2) Menentukan apakah suatu bahan makanan merupakan sumber potensi dari keracunan Staphylococcus dan,
3) Memperlihatkan adanya kontaminasi sesudah pengolahan yang biasanya disebabkan karena kontak manusia atau kontak dengan permukaan yang tidak saniter.

Kesimpulan tentang adanya S. aureus pada bahan makanan perlu dibuat lengkap. S. aureus dalam jumlah yang banyak pada bahan makanan menunjukkan adanya tingkat penanganan dan sanitasi yang buruk, akan tetapi itu Baja tidak dapat untuk menyimpulkan bahwa bahan makanan tersebut sumber dari keracunan. S. aureus yang sudah diisolasi harus dapat menunjukkan adanya enterotoksin. Sebaliknya, jumlah yang sedikit yang ditemukan pada saat pengujian dapat merupakan sisa dari jumlah mikroorganisme yang banyak memproduksi enterotoksin dalam jumlah yang cukup banyak, sehingga dapat menyebabkan keracunan. Oleh sebab itu penguji harus dapat memikirkan kemungkinan tersebut.

Metode untuk penentuan dan perhitungan S. aureus tergantung pada tujuan dari pengujian makanan dan latar belakang dari pengujian. Metode-metode yang digunakan untuk analisis makanan pada umumnya lebih teliti dan cermat dibandingkan dengan pengujian klinis. Bahan makanan yang telah diproses dapat mengandung sel-sel hidup dalam jumlah yang relatif kecil di mana harus diuji dengan analisis yang cocok. Lebih penting lagi analisis S. aureus dalam makanan dapat digunakan sebagai alasan yang kuat akan adanya makanan yang terkontaminasi.

Metode-metode untuk pengujian S. aureus yang telah dipelajari secara kolaboratif dan ditemukan sebagai metode yang sangat cocok terdapat dalam standar ini.

Telah terjadi kontradiksi terhadap keyakinan penggunaan metode pengujian/ pembacaan

koagulasi. Pengalaman terbaru menunjukkan bahwa aktivitas koagulasi yang terdapat pada reaksi 1+, 2+, dan 3+ jarang bersamaan dengan kriteriakriteria kritis S. aureus. Telah dikonsensuskan bahwa reaksi koagulasi 4+ cukup untuk mengklasifikasikan S. aureus. Strain yang lain memberikan reaksi kurang dari $^{4+}$ harus diyakinkan dengan tes-tes lain. Tes-tes lain tersebut terdiri dari fermentasi glucose anaerobik, sensitifitas lisotaphin dan produksi termonuklease. Metode direct plate count sangat cocok untuk analisis bahan makanan dengan perkiraan jumlah koloni S. aureus. $\geq$ 100/gram bahan makanan.

1 Peralatan

1.1 Peralatan dasar seperti pada pengujian TPC (B, 1-7).
1.2 Drying cabinet
1.3 Steril, bent glass streaking rods, hockey stick or hoe shaped, with fire - polished ends, 3 - 4 mm diameter - 15 - 20 cm long, with an angled spreading surface 45 - 55 cm.

2 Media dan Ragensia

2.1 Baird-Parker agar
2.2 Trypticase atau tryptic soy agar
2.3 Brain heart Infusion broth (BHI)
2.4 Coagulase plasma (Rabbit) with EDTA
2.5 Toluidine blue 0-deoxyribonucleic acid agar
2.6 Lysostaphin
2.7 Tryptone yeast extract agar
2.8 Paraffin oil steril 2.9 Tes Catalase
2.10 Phenol Red Carbohydrate Broth
2.11 Phospate Saline buffer.

3 Metode penyiapan bahan

Lihat penyiapan Homogenasi Contoh.

4 Isolasi dan penghitungan

4.1 Untuk setiap pengenceran yang akan ditanam, secara aseptis ambil 1 ml larutan contoh ke dalam 3 petridish berisi Baird Parker agar, pindahkan 1 ml inokulum tersebut secara merata ke dalam 3 petridish tersebut (misalnya 0,4 ml; 0,3 ml; dan 0,2 ml).

4.2 Ratakan inokulum pada permukaan agar dengan menggunakan bent glass streaking rod steril.

4.3 Biarkan petridish dengan posisi menghadap ke atas sampai inokulum tersebut terserap agar (sekitar 10 menit). Jika inokulum tidak dapat diserap secara baik, letakkan petridish

pada inkubator dengan posisi menghadap ke atas selama 1 jam.

4.4 Balik petridish dan inkubasi selama 45 - 48 jam pada suhu 35- 37°C.

4.5 Pilih petridish yang mengandung 20-200 koloni, jika tidak hanya petridish dengan pengenceran yang lebih rendah (> 200 koloni) yang mempunyai ciriciri S. aureus. Ciri-ciri S. aureus adalah berbentuk bunder, halus, cembung, berair; kadang-kadang dengan batas yang berwarna terang (putih kotor), berwarna abu-abu sampai kehitaman, dikelilingi oleh zone yang agak kabur dan kadang dengan zone bagian luar yang lebih jelas; koloni mempunyai konsistensi yang lengket (seperti mentaga/permen karet), apabila disentuh dengan jarum inokulasi. Kadang-kadang, strain non-lipolitik dengan ciri-ciri yang hampir sama dapat mengganggu, kecuali zone sekelilingnya yang berwarna kabur dan jelas tidak ada. Strain yang berasal dari bahan makanan beku atau kering yang telah disimpan dalam waktu yang cukup lama biasanya memberikan koloni yang tidak begitu kehitaman, dengan texture yang kering dan kenampakan yang kasar.

4.6 Penghitungan dan pencatatan koloni

- Apabila beberapa jenis koloni mempunyai kenampakan seperti S uurcus, hitung koloni-koloni tersebut untuk tiap-tiap jenis.
- Dapat digunakan data yang berasal dari petridish dari pengenceran terendah yang mencapai koloni < 20.
- Apabila ada petridish yang mempunyai koloni tersangka > 200 sedangkan petridish dengan pengeceran yang lebih tinggi tidak menunjukkan adanya S. aureus, petridish ini dapat digunakan untuk penghitungan S. aureus. Jangan menghitung koloni yang tidak spesifik.

4.7 Pilih lebih dari 1 koloni dari tiap jenis koloni yang dihitung tersebut dan uji pembentukan koagulasi.

4.8 Tumbuhkan koloni yang memberikan basil positif pada tiap-tiap set (tiap set dilakukan secara triplo) dan kalikan dengan faktor pengenceran.

4.9 Laporkan hasilnya sebagai jumlah S. aureus/g produk bahan makanan.

5 Tes Koagulase

5.1 Pindahkan koloni S. aureus tersangka ke dalam tabung reaksi yang berisi 0,2 - 0,3 BHI broth dan buat emulsi.

5.2 Inokulasi TSA miring dengan suspensi BHI jarum Inokulasi berdiameter.

5.3 Inkubasi suspensi BHI dan TSA miring selama 18 — 24 jam pada suhu 35 — 37°C.

Simpan TSA miring pada suhu ruang untuk tes ancilary atau tes ulangan, apabila tes koagulase memberikan basil yang meragukan.

5.4 Tambahkan 0,5 ml plasma koagulase dengan EDTA ke dalam kultur BHI dan aduk. Inkubasi pada suhu 35 -- 37° C dan periksa tiap-tiap 6 jam terjadinya gumpalan.

5.5 Hanya gumpalan yang kompak dan tinggal di tabung, apabila tabung dimiring-kan/dibalik menunjukkan S. aureus positif. Penggumpalan yang tidak kompak, biasanya memberikan reaksi 2+ dan 3+ memerlukan pengujian lebih lanjut.

5.6 Tes kultur positif (yang sudah diketahui) dan kultur negatif secara bersamaan dengan kultur tersangka yang tidak diketahui aktifitas koagulasenya.

5.7 Buat gram stain untuk semua koloni tersangka dan amati dengan mikroskop.

6 Tes tambahan

6.1 Tes katalase

Gunakan koloni tersangka dari TS/ miring untuk melakukan tes katalase pada gelas preparat untuk melihat pembentukan gelembung gas.

6.2 Pemanfaatan secara aerob (Aerobic utilization) dari:

– Glukose : Inokulasi 1 tabung reaksi berisi Carbohydrate fermentation medium yang mengandung glukose (0,5%); lapisi bagian atasnya dengan minyak parafin steril, dan inkubasi pada suhu 35°C selama 18—24 jam. Perubahan warna yang terjadi dari pewarnaan yang digunakan menunjukkan hasil yang positif. S. aureus memberikan basil yang positif.
– Manitol : ulangi seperti di atas dengan menggunakan manitol sebagai karbohidrat di dalam medium S. aurc'us biasanya memberikan basil yang positif, tetapi beberapa strain memberikan basil yang negatif.
– Kontrol : sebaiknya dilakukan bersamaan (kultur positif, negatif dan media tiontrol).

6.3 Sensitivitas lisosatifin

– Pindahkan koloni yang telah diisolasi dari agar dengan jarum inokulasi berdiameter ke dalam 0,2 ml phosphate saline buffer, dan buat emulsinya. Pindahkan dari suspensi tersebut ke dalam tabung reaksi lain (13 x 100 mm) dan campur dengan 0,1 ml phospate saline water sebagai kontrol. Tambahkan 0,1 ml Lysostafin (yang telah dilarutkan dalam 0,02 M phosphate buffer yang mengandung 1% NaCl) ke dalam tabung aslinya untuk mendapatkan konsentrasi Lysostafin 25/µg per mil.
– Inkubasi ke 2 tabung tersebut pada suhu 37°C selama 2 jam.
– Jika endapan terlihat jelas dalam campuran tersebut, ini memberikan basil positif. Apabila

endapan tidak terbentuk dalam waktu 2 jam, tes menunjukkan basil negatif.

6.4 Tes untuk produksi nuklease termostabil

– Siapkan gelas preparat dengan menuangkan 3 ml Toluidine Blue 0-deoxyribonucleic acid agar pada tiap permukaan slide mikroskop tersebut. Apabila agar telah membeku buat lubang (seperti sumur) dengan diameter 2 mm. Pindahkan potongan agar tersebut dengan hati-hati.
– Tambahkan sekitar 10/µl contoh yang telah dipanaskan (15 menit water bath mendidih) dari kultur broth yang telah digunakan pada tes koagulase ke dalam sumur tersebut.
– Inkubasi slide-slide tersebut ke dalam ruangan yang lembab selama 4 jam pada suhu 37°C. Reaksi positif menunjukkan terbentuknya lingkaran (halo) berwarna merah muda yang cerah berukuran 1 mm dari bagian tepi sumur.
– Tes ini bersifat spesifik seperti juga tes koagulase.

Tes ini tidak begitu bersifat subjektif seperti halnya tes koagulase, sebab tes ini terjadi perubahan warna dari biru ke merah muda cerah. Akan tetapi, tes ini tidak dapat digunakan untuk tujuan menggantikan tes koagulase, tetapi sebagai tes pendukung, terutama bentuk reaksi koagulase 2+.

7 Penentuan Nilai MPN

(Disarankan untuk dilakukan secara rutin terhadap produk bahan makanan untuk pemeriksaan kualitas sanitasi di mana diperkirakan S. aureus berjumlah < 100/gam bahan makanan).

7.1 Peralatan

– Lihat butir 1.

7.2 Media dan Reagensia

– Lihat butir 2.

7.3 Penyiapan contoh

– Lihat butir 3.

7.4 Penentuan nilai Most Probable Number/MPN :

7.4.1 Inokulasi 3 buah tabung yang berisi Trypticase soy atau triptic soy broth yang mengandung 10% NaCl dengan 1 ml larutan contoh yang telah diencerkan. Pengenceran yang tertinggi harus diperkirakan akan memberikan nilai negatif.

7.4.2 Inkubasi pada suhu 35-37° C selama 48 ± 2 jam.

7.4.3 Dengan menggunakan jarum inokulasi berdiameter 3 mm, pindahkan tabungtabung positif (yang terjadi endapan) pada Baird Parker agar yang telah membeku.
7.4.4 "Goreskan" inokulum tersebut.
7.4.5 Inkubasi pada suhu 35-37°C paling sedikit selama 30 jam.
7.4.6 Ambil paling tidak satu sel dari koloni tersangka seperti tersebut pada butir 4.3 ke dalam BHI broth seperti butir 5 & 5.1.
7.4.7 Teruskan ke prosedur identifikasi dan konfirmasi S. aureus (butir 5 dan butir 6).
7.4.8 Catat perubahan-perubahan yang terjadi (jika ada), berdasarkan pada tabungtabung positif pada confirmed test.

7.5 Laporkan S. aureus /g berdasarkan nilai MPN/g sesuai dengan tabel MPN (lampiran III).

Lampiran I: Media pembiakan

Beberapa dari formulasi media tercantum dalam lampiran ini tersedia secara komersial baik dalam bentuk dehidrasi atau yang langsung dapat digunakan. Kecuali adanya ketentuan-ketentuan yang diperlukan, formulasi komersial tersebut telah dibuktikan baik untuk digunakan pada metode pengujian yang tercantum di atas. Akan tetapi instruksi untuk penyiapan media harus benar-benar ditaati.

Beberapa formulasi komersial berbeda dengan formulasi aslinya, sebab :

(1) adanya beberapa modifikasi yang telah dikembangkan atau

(2) pembuat media telah menemukan bahwa beberapa perbedaan konsentrasi dan jenis bahan, kontrol pH yang lebih baik, produktivitas, hambatan dan sebagainya dapat dipertahankan. Perubahan-perubahan ini biasanya mendorong kegunaan dari media untuk tujuan-tujuan tertentu. Perubahan-perubahan formula telah dibuktikan tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroorganisme jika dibandingkan dengan formula aslinya. Selain itu, pengawasan terhadap kualitas dari media komersial memerlukan pengujian-pengujian untuk produktivitas, hambatan dan sebagainya untuk setiap lot media dengan pengujian kontrol mikroorganisme terpilih secara hati-hati. Oleh sebab itu kualitas media dehidrasi pada umumnya mempunyai tingkat yang lebih baik dibandingkan dengan media yang dibuat di laboratorium.

Merupakan suatu hal yang harus dilakukan untuk menginokulasi 1 set mikroorganisme kontrol pada setiap lot media. Pelaksanaan ini sangat disarankan terutama pada laboratorium yang berhubungan dengan riset dan pengembangan metode analisis yang tergantung pada karakteristik biokimia spesifik dari mikroorganisme.

1. Media Baird - Parker

1.1 Basal medium

Tryptone .... 10 g
Beef extract .... 5 g
Yeast extract .... 1 g
Sodium pyruvate .... 10 g
Glycine .... 12 g
Lithium chloride $6H_2O$........................ 5 g
Agar 20g

Larutkan bahan dalam 950 ml aquadest. Didihkan hingga benar-benar larut. Bagikan tiap 95 ml larutan tersebut ke dalam botol bertutup. Autoclave selama 15 menit dengan suhu 121°C. pH akhir 7,5 ± 0,2 pada suhu 25°C. Simpan tidak lebih dari satu bulan pada suhu 4 ± 1°C.

1.2 Pengkayaan - Bacto EY tellurite enrichment

Complete medium. Tambahkan 5 ml pengkayaan yang telah dipanaskan kembali (45¯50°C) ke dalam 95 ml basal medium leleh yang disesuaikan suhunya sampai 45—50°C. Aduk hingga homogen (hindarkan busa), tuang 15¯18 ml ke dalam petridish steril dengan ukuran 15 x 100 mm. Simpan pada suhu 4 ± 1°C selama tidak lebih dari 48 jam sebelum digunakan. Medium hams disimpan dalam tempat yang bulat, jangan gunakan tempat lain. Keringkan media tersebut sebelum digunakan dalam metode-metode sebagai berikut :

a) dalam oven jenis konfeksi atau inkubator sejenis selama 30 menit pada suhu 50°C, tanpa tutup dan permukaan agar menghadap ke bawah.
b) dalam oven atau inkubator dengan udara yang dihembuskan selama 2 jam pada suhu 50°C, tertutup dan permukaan agar menghadap ke atas.
c) dalam inkubator selama 4 jam pada suhu 35°C dengan tutup dan permukaan agar menghadap ke atas.
d) dalam laboratorium selama 16-18 jam pada suhu ruang, dengan tutup dan permukaan gar menghadap ke atas.

2. Brain - Herart Infusion Broth (Bhi)

Calf brain infusion ....200 g
Beef heart infusion ....250 g
Proteose peptone or gelysate ....10 g
Sodium chloride ....5 g
Disodium phosphate (anhydrous) ....2,5 g
Dextrose ....2 g

Larutkan bahan dalam 1 liter aquadest. Panaskan perlahan-lahan jika perlu. Masukkan ke dalam botol atau tabung untuk disimpan, dan autoclave selama 15 menit suhut 121°C. pH terakhir 7,4 ± 0,1

3. Phenol Red Carbohydrate Broth.

Trypticase atau proteose peptone # 3 ....10 g
Sodium chloride ....5 g
Beef extract (jika diperlukan) ....1 g
Phenol red (atau 7,2 ml dari 0,25%
larutan phenol) ....0,018 g
Aquadest ....1 liter

Larutkan 5 g dulcitol, 10 g lactose atau 10 g sucrose (seperti pada pengujian salmonella) dalam basal broth ini. Pindahkan tiap 2,5 ke dalam tabung reaksi 13 x 100 mm yang berisi 6 x 50 mm tabung fermentasi terbalik. Autoclave 118°C, 10 menit pH akhir 7,3 ± 0,2.

Cara lain, larutkan bahan, pisahkan karbohidrat, dalam 800 ml air dan panaskan dengan pengadukan; pindahkan tiap-tiap 2 ml ke dalam tabung reaksi 13 x 100 mm yang berisi tabung fermentasi terbalik. Autoclave 118°C, 15 menit, dan biarkan hingga dingin. Larutkan

karbohidrat dalam 200 ml air, dan sterilisasi dengan menyaring larutan dengan filter penahan bakteri. Secara aseptis tambahkan 0,5 ml filtrat steril ke dalam tiap tabung broth steril setelah pendinginan sampai 45°C. Kocok perlahan-lahan, pH akhir 7,4 ± 0,2.

4. Toluidine Blue - Dna Agar Formula

Deoxyribonucleic acid (DNA) ....0,3 g
Agar ....10 g
Calcium chloride (tidak mengandung air) ....1,1 g
Sodium chloride ....10 g
Toluidine Blue 0 ....0,083 g
Tris (hydroxymethyl) aminomethane ....6.1 g

Larutkan tris (hydroxymethyl) aminomethane dalam 1 liter aquadest dan sesuaikan sampai pH 9,0. Tambahkan bahan-bahan sisanya kecuali Toluidine Blue 0 dan didihkan untuk mendapatkan larutan yang merata antara DNA dan agar. Larutkan Toluidine Blue 0 dalam larutan tersebut dan pindahkan dalam porsi yang lebih kecil ke dalam labu dengan bertutup karet. Tidak diperlukan sterilisasi.

Medium stabil dalam suhu ruang untuk jangka waktu 4 bulan dan cukup memuaskan meskipun telah menjalani beberapa kali pelelehan.

5. Trypticase Soy Agar

Trypticase peptone .... 15,0 g
Phytone peptone ....5,0 g
Sodium chloride .... 5,0 g
Agar .... 15,0 g
Aquadest .... 1000 ml

Tambahkan bahan-bahan ke dalam air. Didihkan dengan mengaduk selama 1 menit. Pindahkan medium pada tabung-tabung atau labu-labu yang cocok. Sterilisasi 121°C, 15 menit. pH akhir 7,3 ± 0,2. Tambahkan 25 g NaCl lagi apabila digunakan untuk media V. parahaemolyticus.

6. Tryptone Yeast Extract Agar

Tryptone (Difco) .... 10 g
Yeast extact (Difco) ....1 g
Carbohydrate .... 10 g
Bromcresol purple .... 0,04 g
Agar (Difco) ....2,0 g

Sesuaikan pH sampai 7,0 dan pindahkan ke dalam tabung reaksi 16 x 120 mm sampai 2/3 nya. Autoclave 115° C, 20 menit. Setelah digunakan, kukus medium selama 10—15 menit

untuk mengeluarkan O_2 ; kemudian bekukan dengan meletakkan tabung dalam air es. Segera, inikulasi tiap tabung dengan jarum inokulasi berdiameter yang sarat. Tutup permukaan agar dengan lapisan parafin oil steril dengan ketebalan minimum 25 mm. Inkubasi selama 5 hari pada suhu 37° C. Asam diproduksi secara anaerob apabila indikator berubah menjadi kuning pada seluruh tabung.

Lampiran II: Reagensia dan Diluen

1 Mineral Oil

Autoclave pada suhu 121°C, 30 menit, sebaiknya dalam wadah bertutup yang terisi '/znya bila diisi 20-50 ml .

2 Tes Catalase

Miringkan kultur agar dan tuang 1 ml hydrogen peroxide 3% pada pertumbuhan. Terbentuknya gelembung-gelembung gas menunjukkan hasil positif. Cara lain, dengan membuat emulsi koloni dengan 1 tetes hydrogen peroxide 3% pada gelas preparat. Gelombang yang terbentuk seketika menunjukkan hasil positif. Apabila koloni diambil dari blood agar plate, sel darah merah yang terbawa akan memberikan hasil yang menyesatkan.

3 Phospate Saline Buffer (pH 7,3 - 7,4 0,02 M).

Siapkan larutan stok dari 0,2 M mono- dan disodium phosphate dalam 8,5% larutan garam. Encerkan hingga 1 : 10 untuk pembuatan 0,02 M phospate saline buffer.

Larutan stok 1

Na_2 HOP_4 (Reagensia murni yang tidak mengandung air)	28,4 g
NaCl (Reagensia murni)	85,0 g
Aquadest, cukup untuk membuat	1000 ml

Larutan stok 2

NaH_2 PO_4 . H_2 0 (Reagensia murni)	27,6 g
NaCl (Reagensia murni)	85,0 g
Aquadest, cukup untuk membuat	1000 g

Buat pengenceran 1 : 10 dari tiap-tiap stok untuk mendapat 0,02 M phosphate saline (0,85%) buffers, yaitu :

Larutan stok 1 .... 50 ml
Aquadest .... 450 ml
Perkiraan pH = 8,2

Larutan stok 2 .... 10,0 ml
Aquadest .... 90,0 ml
Perkiraan pH = 5,6

Dengan pH meter, buat larutan 1 yang telah diencerkan sampai pH 7,3 dengan menambah

menambahkan sekitar 65 ml larutan 2 yang telah diencerkan.
Hasil larutan adalah 0,02 M phosphate saline buffer untuk digunakanpada tes ketahanan lysostaphin pada Stap. aureus.

Jangan membuat 0,2 M phosphate buffer menjadi pH 7,3 - 7,4 dan kemudian dilarutkan sampai berkekuatan 0,02 M. Hasilnya akan mengalami penurunan pH sekitar 0,25. Penambahan 0,85% garam setelah penyesuaian pH juga akan menurunkan pH sekitar 0,2.

Lampiran III: PMN - Most Probable Number

1. Pendahuluan

Teknik Most Probable Number (MPN) menggunakan pendekatan "pengenceran berganda hingga punah" yang telah dibuktikan sangat baik untuk memperkirakan populasi mikroorganisme, terutama pada situasi di mana mikroorganisme ada dalam jumlah yang sangat sedikit, dimana makanan tertentu dapat menyulitkan metode penghitungan lainnya, atau di mana media tertentu atau sistim pembiakan tertentu dibutuhkan. Untuk sebagian besar produk-produk makanan dan bahan-bahan makanan, struktur contoh atau karakteristiknya, dapat menyulitkan penggunaan prosedur penghitungan koloni apabila densitas mikroorganisma per gram makanan berjumlah kurang dari 10. Dalam keadaan ini, metode MPN sangat berguna untuk memperkirakan jumlah mikroba, terutama untuk populasi yang sangat sedikit. Contoh penggunaan dari metode ini adalah untuk memperkirakan coliform di air, produk-produk ternak dan jenis-jenis makanan lain.

Pada makanan yang terkontaminasi, baik secara alamiah atau insidensial, distribusi mikroorganisme pada produk makanan dapat terjadi pada permukaan makanan, dapat tersebar secara homogen pada seluruh makanan atau terdapat pada bagian tertentu dalam makanan. Nilai-nilai yang terdapat pada tabel MPN dihitung berdasarkan dari asumsi bahwa mikroorganisme yang dicari berada dalam contoh makanan secara homogen. Pada contoh makanan dan larutannya, lemak dan partikel yang tidak dapat larut akan menghalangi tingkat homogenitas yang diasumsikan. Karena alasan ini, maka nilai MPN yang diperoleh dari contoh makanan akan kurang akurat dari pada nilai MPN yang diperoleh dari air di mana homogenitas contoh lebih mudah didapat.

Pada umumnya, hasil yang diperoleh dari prosedur MPN kurang akurat dibandingkan dengan prosedur penanaman. Misalnya, pada penghitungan Enterobacter aerogenes, prosedur penanaman non selektif lebih baik dari pada MPN. Apabila organisme yang sama akan dihitung pada contoh-contoh seperti air sungai, dimana spesies bakteri dominan lain juga ada, prosedur MPN dapat dipilih. Kadang keakurasian harus diabaikan, sebab kurangnya prosedur penanaman yang baik, atau adanya kebutuhan untuk menguji larutan contoh dalam volume yang besar dipenuhi dengan material-material tertentu dan tercampur dengan spesies-spesies bakteri lainnya.

Tergantung dari pengambilan contoh dan informasi yang dicari, contoh harus dicampur (diaduk) atau dimaserasi untuk mendapatkan distribusi mikroorganisme yang homogen. Pada saat contoh yang homogen dibagi menjadi sub-contoh melalui suatu serf pengenceran, beberapa dan sub-contoh akan mengandung sejumlah kecil contoh yang mana ini tidak mengandung mikroorganisme yang dicari. Ada dan tidak adanya sel-sel mikroba dalam sub

contoh dapat digunakan untuk secara statistik memperkirakan populasi mikroba dalam contoh aslinya. Metoda MPN didasarkan pada pembagian contoh dan oleh karena itu dapat digambarkan sebagai "metode pengenceran berganda punah". Akurasi dari satu kali pengujian tergantung dari jumlah tabung yang digunakan untuk tiap pengenceran. Informasi yang sangat memuaskan akan diperoleh apabila semua tabung dengan porsi besar menunjukkan pertumbuhan, dan tabung-tabung dengan porsi kecil menunjukkan tidak adanya pertumbuhan.

2. Penanganan Contoh

Pengumpulan contoh, pengirimannya dan pemeriksaan contoh hares dilakukan dengan cara yang aseptis dan dapat mewakili lot makanan yang diperiksa. Penggunaan alat-alat pengujian, media dan reagensia serta pelaksanaan pengujian harus sesuai dengan jenis bakteri yang ditentukan.

Dalam pengujian contoh, disarankan untuk menggunakan satu set tabung dari setiap kelompok medium yang diuji sebagai kontrol yang tidak di inokulasi. Seandainya, sebagai contoh, metode MPN 5 tabung yang digunakan, maka 1 set berisi 5 tabung harus diinkubasi sebagai kontrol yang tidak diinkubasi untuk meyakinkan bahwa medium yang digunakan benar-benar steril. Selain itu temperatur inkubator juga harus dikontrol.

3. Keterbatasan Metode MPN

Metode ini umumnya digunakan apabila densitas mikroba dalam makanan adalah rendah; oleh sebab itu, lebih umum digunakan contoh dalam ukuran yang besar. Apabila contoh mengandung substansi penghambat, atau contoh itu sendiri adalah penghambat (yaitu NaCl), pertumbuhan dalam tabung-tabung dengan konsentrasi contoh yang tinggi akan terhambat;

Metode MPN untuk penghitungan umumnya digunakan untuk menentukan jumlah mikroorganisme dari jenis-jenis tertentu. Pada saat digunakan media-media selektif untuk beberapa jenis mikroorganisme digunakan. Jenis bakteri yang dapat dihitung meliputi salmonella, staphylococcus, coliform, faecal caliform, E coli dan lain-lainnya.

4. Prosedur

Pengaturan dan pengenceran contoh untuk metode MPN identik dengan prosedur untuk penghitungan koloni. Perbandingan volume medium harus dipertimbangkan. Pada dasarnya, 1 bagian dan 10 bagian medium harus digunakan. Jadi, apabila 10 g contoh digunakan, ini harus dilarutkan ke dalam 100 ml medium. Apabila mikroorganisme ada dalam cairan atau dalam contoh yang dilarutkan akan dihitung, konsentrasi dari medium dapat disesuaikan sehingga konsentrasi medium setelah ditambahkan contoh akan sesuai dengan medium

berkekuatan tunggal. Apabila medium berkekuatan ganda digunakan, maka dapat ditambahkan contoh atau larutan pengenceran dalam jumlah yang setara. Apabila menggunakan contoh yang tidak menimbulkan partikel-partikel seperti awan dalam medium, terbentuknya endapan setelah inkubasi dapat digunakan untuk mendeteksi pertumbuhan (tabung positif). Akan tetapi, dalam beberapa kasus, contoh dapat terlihat dengan jelas sehingga endapan tidak dapat terlihat. Untuk ini, harus digunakan metode lain.
Gas yang diproduksi akibat aktivitas mikroorganisme dapat ditangkap dan diperiksa. Ini dapat dilakukan dengan alat penangkap gas atau tabung kecil yang diletakkan terbalik dalam medium, sebelum dilakukan sterilisasi. Reaksi positif terjadi apabila terdapat gelembung-gelembung gas di dalam tabung terbalik tersebut.

5. Pembacaan Data

Apabila metode tabung berganda digunakan, hasilnya dinyatakan sebagai "most probable number mikroorganism per gram". Tabel II dan III menunjukkan most probable number mikroorganism yang setara dengan frekuensi tabung-tabung positif, yang diperoleh dari variasi sistem inokulasi porsi berganda yang dimulai dengan tes 1 ml bagian dari pengenceran 1 : 10 (0,1 g bagian). Karena kemungkinan lebih dari 1 mikroorganisme bertanggung jawab terhadap basil pengujian yang positif, penghitungan dari MPN mikroorganisme menggunakan fungsi logaritma.

Untuk mendapatkan nilai MPN, tentukan jumlah setiap tabung positif dari 3 pengenceran terpilih. Lihat tabel MPN dan catat hasilnya.

TABEL I

Contoh dan pemecahan hasil yang diperoleh apabila lebih dari 3 porsi berbeda digunakan.

Contoh	0,1 g	0,01 g	0,001 g	0,0001 g
a)	5/5*	5/5	2/5	0/5
b)	5/5	4/5	2/5	0/5*
c)	0/5	1/5	0/5	0/5*
d)	5/5	3/5	1/5	1/5
e)	5/5	3/5	2/5	0/5*

Keterangan :
Apabila semua tabung memberikan nilai positif, pilih 3 volume terkecil yang diuji, dan tanda lebih besar (>) digunakan untuk menunjukkan bahwa nilai MPN lebih besar dari yang diberikan.

Apabila lebih dari 3 volume berbeda digunakan, gunakan basil hanya 3 volume berturut-turut (Tabel I). Gunakan basil dari volume terkecil yang mana memberikan 5/5, dan basil yang diperoleh pada 2 volume berikutnya. Hasil dari contoh ini adalah ekstrim; angka dengan tanda (*) tidak boleh digunakan dalam penghitungan. Contoh c dimana tidak ada 1 volume

pun yang memberikan 5/5, 3 volume terdepan harus digunakan untuk mendapatkan basil positif pada volume tengah. Apabila basil positif terjadi pada volume yang lebih kecil dari 3 volume yang dipilih sesuai dengan ketentuan (contoh d), tambahkan nilai yang lebih tinggi dari batas basil ke nilai di atas batas yang berasal dan volume terkecil yang dipilih, sehingga memberikan hasil seperti pada contoh e.

Terkadang, dirasakan perlu untuk menghitung MPN dari volume terdahulu dari yang tercantum dalam tabel II dan III. Apabila porsi tertinggi yang digunakan untuk tabel acuan adalah 0,01 g dari pada 0,1 g, kalikan nilai MPN pada tabel dengan 10. Oleh sebab itu, basil dari penentuan MPN dengan 5 tabung yang menunjukkan 3 tabung positif dengan porsi 0,01 g, dan 2. positif dengan 0,001 g, dan positif dengan porsi 0,0001 g (3 - 2 - 1) yang berdasarkan tabel II menunjukkan basil 17, dan dikalikan dengan 10 untuk mendapatkan nilai 170 sebagai basil MPN/g contoh. Begitu juga, apabila porsi tertinggi yang digunakan untuk tabel acuan adalah 10,0 g bukan 0,1 g, bagi nilai MPN dari tabel dengan 100. Oleh sebab itu, basil dari penentuan MPN dengan 3 tabung untuk salmonella yang memberikan basil 3 positif pada seluruh tabung dengan porsi 10 g 1 positif dengan porsi 1 g, dan tidak ada tabung positif dengan porsi 0,1 g (3 - 1 - 0), yang berdasarkan tabel III menunjukkan hasil 43, dan dibagi dengan 100 untuk mendapatkan nilai 0,43 sebagai hasil MPN/g contoh.
Cara penghitungan lain untuk mendapatkan nilai MPN per gam makanan adalah dengan menggunakan rumus :

$$\frac{\text{MPN dari tabel}}{100} \times \text{faktor pengenceran dari tabung tengah} = \text{MPN/gam.}$$

Semua pengamatan statistik tercantum dalam batas kepercayaan yang tercantum dalam 2 tabel tersebut. Interpretasi dari batasan-batasan tersebut adalah apabila seseorang mengatakan bahwa densitas sebenarnya dari organisme berkisar antara ke dua batasan ini, maka is akan berada pada 95%, dari pernyataannya.

Penghitungan mikrobiologi hams dicatat sebagai "jumlah mikroorganisme per kuantitas contoh dengan metode MPN", contohnya, MPN coliform = 10/g. Dalam pelaporannya, perlu pula dijelaskan jumlah tabung yang digunakan untuk tiap pengenceran, misalnya 5 tabung MPN dan atau 3 tabung MPN dan metode yang digunakan.

TABEL II

Most Probable Number (MPN) per 1 g contoh dan 95% tingkat kepercayaan

Menggunakan lima tabung dengan porsi 0,1; 0,01 dan 0,001					
Jumlah positif			MPN	Batas MPN	
0,1	Tabung 0,01	0,001	/g	Bawah	Atas
5	2	2	94	28	219
5	2	3	120	33	281
5	2	4	148	38	366
5	2	5	177	44	515
5	3	0	79	23	187
5	3	1	109	31	251
5	3	2	141	37	343
5	3	3	175	44	503
5	3	4	212	53	669
5	3	5	253	77	778
5	4	0	130	35	300
5	4	1	172	41	484
5	4	2	221	57	698
5	4	3	278	90	849
5	4	4	345	117	999
5	4	5	436	145	1161
5	5	0	240	68	734
5	5	1	348	118	1005
5	5	2	542	180	1405
5	5	3	920	210	3000
5	5	4	1600	350	5300
5	5	5	1600	800	—

TABEL III

Most Probable Number (MPN) per 1 g contoh dan 95% tingkat kepercayaan

Menggunakan tiga tabung dengan porsi 0,1; 0,01 dan 0,001					
Jumlah positif			MPN	Batas MPN	
0,1	Tabung 0,01	0,001	/g	Bawah	Atas
0	0	0	< 3	—	—
0	0	1	3	0,5	9
0	1	0	3 <	0,5	9
1	0	0	4 <	0,5	13
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	159
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	1	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1.300
3	3	1	460	71	2.400
3	3	3 >	2.400	—	—